HTLV I/II ELISA 3.0

CE
0123

DATE DE RÉVISION : 11/05
MBN 0011-FRA-1

Remarque: modifications en surbrillance.

REF 21080-096T : (trousse de 96 tests)
21080-192T : (trousse de 192 tests)
21080-480T : (trousse de 480 tests)

NOM ET APPLICATIONS

Le test HTLV I/II ELISA 3.0 de MP Diagnostics (MPD) est un test Elisa destiné à la détection des anticorps dirigés contre les virus HTLV-I et HTLV-II dans le sérum ou le plasma humain. Il est prévu pour être utilisé comme test de dépistage, les tests positifs devront être confirmés.

DESCRIPTION DES SYMBOLES UTILISÉS

Les symboles graphiques utilisés sur les produits et emballages des produits **MP Diagnostics** ci-dessous. Ces symboles sont ceux qui apparaissent le plus fréquemment sur les dispositifs médicaux et sur leurs emballages. Ils sont décrits plus en détails dans la notice de normalisation "British and European Standard" BS EN 980: 2003.

- Utiliser avant *Synonyme :* Date de péremption
- IVD — Dispositif médical à usage diagnostique in vitro
- LOT — Code du lot de fabrication *Synonymes :* Numéro de lot, Numéro de lot de fabrication
- REF — Numéro du catalogue
- Limites de température
- Attention ! Voir les instructions d'utilisation
- Fabricant
- EC REP — Représentant agréé dans la Communauté européenne
- Contenance suffisante pour <n> tests
- Consulter les instructions d'utilisation
- Ne pas réutiliser

INTRODUCTION

Les récentes études épidémiologiques menées aux États-Unis et en Europe confirment l'existence d'une prévalence mixte de chacun des deux virus HTLV-I et HTLV-II au sein de diverses populations à risque, tels que les consommateurs de drogue par voie intraveineuse et les sujets ayant subi une ou plusieurs transfusions. Étant donnée la réactivité croisée entre les sérums anti-HTLV-I et anti-HTLV-II d'une part et le lysat viral d'autre part, la première génération de tests de dépistage utilisait le lysat viral du HTLV-I et la deuxième génération utilisait le lysat viral du HTLV-I et des antigènes recombinants. Cependant, les immunodosages de première et deuxième génération utilisant le lysat viral des HTLV-I/II qui sont actuellement disponibles manquent de sensibilité pour l'identification du HTLV-II et présentent un niveau important de faux positifs au sein des sérums de sujets non infectés.

La détection des anticorps dirigés contre les HTLV-I et HTLV-II nécessite l'utilisation d'un test HTLV-I/II ELISA à fortes sensibilité et spécificité.

Le test **HTLV I/II ELISA 3.0 de MP Diagnostics** emploie uniquement une combinaison d'antigènes recombinants. Ce mode de test garantie la détection du HTLV-I tout comme du HTLV-II par des épitopes spécifiques.

Le test **HTLV I/II ELISA de 3.0 MP Diagnostics** est prévu pour être utilisé comme test qualitatif pour la détection des anticorps dirigés contre les virus HTLV-I et HTLV-II dans le sérum ou le plasma humain. Le test est prévu pour le dépistage initial et nécessite l'analyse répétée des prélèvements initialement positifs, ainsi que la confirmation du caractère positif reproductible des prélèvements à l'aide de tests supplémentaires tels que le **HTLV BLOT 2.4 MPD**.

PRINCIPES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DU TEST

Les puits de la microplaque sont recouverts d'un mélange d'antigènes recombinants du HTLV-I et du HTLV-II correspondant aux segments fortement antigéniques de ces deux virus. Les échantillons de sérum ou plasma humain, dilués dans un tampon diluant, sont mis en incubation dans ces puits. Les anticorps spécifiques anti- HTLV-I/II, s'il sont présents, se fixeront sur les antigènes immobilisés sur la phase solide. Les puits sont lavés abondamment afin d'éliminer les substances non fixées et un anticorps de chèvre anti-IgG humaine purifié par affinité et marqué à la peroxydase de raifort est ajouté aux puits. Cet anticorps marqué se fixera sur tout complexe antigène-anticorps préalablement formé et les anticorps marqués non fixés en excès seront éliminés par lavage. Une solution de substrat contenant du 3,3',5,5' - tétraméthylbenzidine (TMB) est alors ajoutée à chaque puits. L'apparition d'une coloration bleue après ajout du substrat indique la présence d'anticorps spécifiques. La réaction est interrompue par ajout d'acide chlorhydrique. L'intensité du produit réactionnel jaune est mesurée par spectrophotométrie à 450 nm et elle est proportionnelle à la quantité d'anticorps présente dans le prélèvement.

ÉLÉMENTS DE LA TROUSSE

Description du matériel	Quantité fournie		
MICROPLATE			
MICROPLAQUE HTLV Douze barettes de 8 puits par plaque. Chaque puits de la microplaque contient des protéines recombinantes adsorbées du HTLV-I et du HTLV-II. Conserver entre 2°C et 8°C.	1 PLAQUE 96 tests	2 PLAQUES 192 tests	5 PLAQUES 480 tests
CONTROL − ⚠			
CONTRÔLE NÉGATIF Sérum humain normal, anti-VHC, anti-VIH-1/2, anti-HTLV-I/II et AgHBs négatif. Contient du thiomersal et de l'azide de sodium comme conservateurs. Contenu : 280 µl par ampoule Conserver entre 2°C et 8°C.	1 ampoule	2 ampoules	3 ampoules
CONTROL + ⚠			
CONTRÔLE POSITIF Sérum humain inactivé à fort titrage en anticorps anti-HTLV-I/II, et anti-VHC, anti-VIH-1/2 et AgHBs négatif. Contient du thiomersal et de l'azide de sodium comme conservateurs. Contenu : 300 µl par ampoule Conserver entre 2°C et 8°C.	1 ampoule	2 ampoules	4 ampoules
DILUENT ⚠			
DILUANT Solution saline à base de Tris contenant du sérum de chèvre normal traité par la chaleur, de l'albumine sérique bovine et des stabilisants. Contient du Bronidox™ comme conservateur. Contenu : 100 ml par flacon Conserver entre 2°C et 8°C.	1 flacon	1 flacon	2 flacons
WASH PLATE 20X ⚠			
SOLUTION DE LAVAGE CONCENTREE (20X) Solution phosphate saline tamponnée avec du Tween 20. Contient du chloroacétamide comme conservateur. Contenu : 120 ml par flacon. Conserver entre 2°C et 8°C.	1 flacon	1 flacon	2 flacons
CONJUGATE T			
CONJUGUÉ Anticorps anti-IgG humaine de chèvre marqué à la peroxydase de raifort. Contenu : 45 µl par ampoule Conserver entre 2°C et 8°C.	1 ampoule	2 ampoules	3 ampoules
SUBS TMB ⚠			
SUBSTRAT Tampon contenant du 3,3',5,5' - tétraméthylbenzidine (TMB). Conserver dans l'obscurité entre 2°C et 8°C. Contenu : 12.5 ml par flacon	1 flacon	2 flacons	5 flacons
SOLN STOP HCl 1N ⚠			
SOLUTION D'ARRÊT Solution d'acide chlorhydrique 1N. Conserver dans l'obscurité entre 2°C et 8°C. Contenu : 30 ml par flacon	1 flacon	1 flacon	2 flacons
FILMS COUVRE-PLAQUES Films adhésifs pour couvrir la microplaque pendant l'incubation	4 pièces	8 pièces	20 pièces
MODE D'EMPLOI	1 exemplaire	1 exemplaire	1 exemplaire

** Bronidox™ est une marque déposée de Henkel Chemical Co.*

PRÉCAUTIONS D'UTILISATION

1. Utilisation réservée au diagnostic *in vitro*.
2. Utilisation réservée aux professionnels.
3. Consulter l'emballage du produit pour connaître les composants susceptibles de présenter un risque biologique.

INFORMATIONS RELATIVES À LA SÉCURITÉ ET LA SANTÉ

⚠ **ATTENTION:** Cette trousse contient des substances d'origine humaine. Aucune technique de test ne permet de garantir totalement que les produits sanguins humains ne vont pas transmettre une infection.

MANIPULER LES PRÉLÈVEMENTS À TESTER ET LES CONTRÔLES POSITIFS ET NÉGATIFS COMME S'IL S'AGISSAIT D'AGENTS POTENTIELLEMENT INFECTIEUX.
Il est recommandé de manipuler les composants et les spécimens à analyser conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire. Ils doivent également être éliminés dans le respect des règles de sécurité en vigueur.

Le ***Contrôle positif*** et le ***Contrôle négatif*** contiennent du thiomersal et de l'azide de sodium. L'azide de sodium peut réagir au contact du cuivre et du plomb présents dans certaines tuyauteries pour former des sels explosifs. Les quantités utilisées dans cette trousse sont limitées. Toutefois, lors de leur élimination, les substances contenant des azides doivent être rincées abondament afin d'éviter la formation d'azides métallisés dans les tuyauteries. Ci-après figurent les énoncés des dangers (R) et mesures de sécurité (S) correspondants.

R20/21/22	Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion.
R32	Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.
S7-32	Conserver le récipient bien fermé. Ne pas respirer les vapeurs.
S35	Ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toutes les précautions d'usage.
S36	Porter un vêtement de protection approprié.
S46	En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette.

Le ***diluant*** contient du Bronidox et du Tris ; celui-ci est classé comme irritant (Xi) par les directives applicables de la Communauté européenne (CEE). Ci-après figurent les énoncés des dangers (R) et mesures de sécurité (S) correspondants.

R36/38 Irritant pour les yeux et la peau.
S26/28 En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau.

La ***solution concentrée de lavage de plaque (20X)*** contient du chloroacétamide à 2 %, classé comme irritant (Xi) par les directives applicables de la Communauté européenne (CEE). Ci-après figurent les énoncés des dangers (R) et mesures de sécurité (S) correspondants.

R22-43 Nocif en cas d'ingestion. Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau.
S22-36/37-45 Ne pas respirer les poussières. Porter un vêtement de protection et des gants appropriés. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette).

1. Éviter toute contamination microbienne des réactifs lors de l'ouverture des flacons et du prélèvement des aliquotes de produit.
2. Ne pas pipeter avec la bouche.
3. Manipuler les spécimens à tester, les microplaques et les Contrôles positifs et négatifs comme s'il s'agissait d'agents potentiellement infectieux.
4. Porter une blouse de laboratoire et des gants jetables pendant le déroulement du test. Jeter les gants dans des sacs poubelle destinés aux matériaux présentant des dangers biologiques. Se laver abondamment les mains par la suite.
5. Il est fortement recommandé de procéder à ce test dans un local prévu pour les opérations présentant des dangers biologiques.
6. Ne pas placer d'aliments et de boissons à proximité des produits.
7. En cas d'accident ou de contact avec les yeux, rincer immédiatement avec une grande quantité d'eau et consulter un médecin.
8. Consulter immédiatement un médecin en cas d'ingestion de substances contaminées ou de mise en contact avec des plaies ouvertes ou autres lésions cutanées.
9. L'acide chlorhydrique peut causer des brûlures. **ÉVITER TOUT CONTACT.** En cas de contact avec la peau, laver abondamment avec de l'eau..
10. Éviter tout contact de l'acide chlorhydrique avec des agents oxydants ou des métaux.
11. Ne pas exposer le tampon et le comprimé de substrat à une forte luminosité. Utiliser des pinces non métalliques pour manipuler le comprimé d'OPD.
12. Ne jamais ajouter d'eau à la Solution d'arrêt.
13. Essuyer immédiatement les éclaboussures de substances potentiellement infectieuses à l'aide de papier absorbant et nettoyer la zone contaminée à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 1 % avant de reprendre le travail. L'hypochlorite de sodium ne doit être utilisé sur les éclaboussures contaminantes acides à moins que la zone n'ait été préalablement essuyée et séchée à l'aide de papier absorbant. Le matériel utilisé (y compris les gants jetables) doit être éliminé comme s'il s'agissait de matériaux susceptibles de présenter un danger biologique. Ne pas mettre à l'autoclave les matériaux contenant de l'hypochlorite de sodium.
14. Mettre tous les matériaux utilisés et contaminés à l'autoclave à 121°C (15 p.s.i) pendant 30 minutes avant élimination. Il est également possible de décontaminer les matériaux dans une solution d'hypochlorite de sodium à 5 % pendant 30 à 60 minutes avant de les éliminer dans des sacs poubelle pour produits présentant un danger biologique.
15. Décontaminer tous les produits chimiques et réactifs utilisés en y ajoutant le volume d'hypochlorite de sodium nécessaire pour arriver à une concentration finale d'au moins 1 %. Laisser reposer pendant 30 minutes pour garantir le succès de la décontamination.

PRÉCAUTIONS D'UTILISATION

1. Les échantillons sériques ou plasmatiques recueillis dans l'EDTA, l'héparine ou le citrate de sodium peuvent être utilisés. Avant de les stocker, vérifier que les caillots sanguins ou les cellules sanguines ont été séparés par centrifugation.
2. Le fonctionnement optimal du test n'est possible que dans le **RESPECT ABSOLU** de la procédure décrite dans ce mode d'emploi. Le non-respect de cette procédure peut conduire à l'obtention de résultats aberrants.
3. **NE PAS MODIFIER OU ÉCHANGER DES RÉACTIFS PROVENANT DE TROUSSES DIFFÉRENTES.** La correspondance des contrôles, conjugué et microplaques a été étudiée pour un fonctionnement optimal. Utiliser uniquement les réactifs fournis avec la trousse.
4. Ne pas utiliser les composants de la trousse au-delà de la date de péremption figurant sur l'emballage de la trousse.
5. Éviter toute contamination microbienne des réactifs lors de l'ouverture des flacons et du prélèvement des aliquots de produit. Ceci réduirait prématurément la durée de conservation des trousses et pourrait conduire à l'obtention de résultats erronés. Utiliser des techniques aseptiques, notamment les pipettes ou les embouts de pipette jetables, lors du prélèvement des aliquots de produit dans les flacons.
6. Afin d'éviter toute contamination croisée, utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque échantillon et ne pas toucher le haut ou le bas des bandelettes, le bord des puits ou le liquide qu'ils contiennent avec les doigts ou l'embout de la pipette.
7. Il est recommandé de nettoyer la verrerie devant être utilisée pour les réactifs à l'aide d'acide chlorhydrique à 2 M et de la rincer abondamment à l'eau distillée ou désionisée avant utilisation.
8. Pour des résultats optimaux, laisser tous les réactifs et échantillons arriver à température ambiante (25°C ± 3°C) avant utilisation. Après utilisation, les replacer immédiatement entre 2 et 8°C pour conservation.
9. Utiliser exclusivement de l'eau désionisée ou distillée de qualité réactif pour diluer les réactifs.
10. Tous les réactifs doivent être convenablement mélangés avant utilisation.

11. La solution de conjugué de travail et le tampon de lavage dilué doivent être **préparés juste avant utilisation.**
12. Ne pas exposer les réactifs ou réaliser les analyses dans une zone présentant un niveau élevé de vapeurs chimiques désinfectantes (par exemple, des vapeurs d'hypochlorite) au cours de leur conservation ou de l'incubation. Une telle mise en contact inhibe la réaction de coloration. Ne pas exposer non plus les réactifs à une forte luminosité.
13. Ne sortir les microplaques de leur pochette de conservation qu'au moment précis de leur utilisation. Les bandelettes non utilisées dont l'emballage a été ouvert doivent être conservées entre 2 et 8°C dans leur pochette de conservation avec l'agent de dessiccation fourni.
14. Les contrôles de la trousse doivent être dosés en même temps que les échantillons des patients à chaque cycle de test.
15. Prendre soin de ne pas toucher ou éclabousser le bord du puits avec le conjugué. Ne pas souffler dans la micropipette. Il est recommandé de procéder, dans la mesure du possible, à un pipetage inverse.
16. L'utilisation d'échantillons fortement hémolysés, de sérums non totalement coagulés, d'échantillons plasmatiques contenant de la fibrine ou d'échantillons ayant subi une contamination microbienne risque de conduire à l'obtention de résultats erronés.
17. **NE PAS INCUBER LES PLAQUES AU BAIN-MARIE.**
18. Les incubateurs à CO_2 ne doivent pas être utilisés.
19. Lors de l'incubation à 37°C, toute évaporation doit être évitée. Couvrir les plaques à l'aide des films adhésifs couvre-plaques fournis.
20. Éviter d'ouvrir et fermer trop fréquemment la porte de l'incubateur au cours des étapes d'incubation.
21. Ne pas conserver la solution d'arrêt dans un récipient peu profond et ne pas la replacer dans le flacon de stockage après utilisation.
22. Vérifier que le bas de la plaque est propre et sec et que la surface du liquide ne présente aucune bulle avant de lire les résultats sur la plaque. Supprimer les bulles du puits, par exemple en tapotant délicatement.
23. Avant utilisation, vérifier que les équipements automatisés, s'ils sont utilisés, sont validés.
24. Il est fortement recommandé de procéder régulièrement à l'entretien du système d'aspiration / de lavage afin d'éviter la contamination des spécimens négatifs par les spécimens fortement positifs.

INSTRUCTIONS DE CONSERVATION

1. Conserver la trousse HTLV I/II ELISA 3.0 de MPD et ses composants entre 2 et 8°C en dehors des périodes d'utilisation.
2. Lorsqu'ils sont conservés entre 2 °C et 8 °C, tous les réactifs et toutes les bandelettes de test fermés ou non ouverts restent stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur la trousse. Ne pas congeler les réactifs.
3. Après ouverture, le contenu de la trousse reste stable pendant 12 mois. Toute trousse **fermée** ou **ouverte** devient obsolète à la première date de péremption.
4. Des cristaux peuvent se former lorsque le Concentré de lavage de plaque (20x) est conservé entre 2 et 8°C. Ils doivent être dissous par réchauffement à 37°C avant utilisation.
5. Un précipité peut se former lorsque le Diluant est conservé entre 2 et 8°C. Ceci n'a aucune incidence sur le fonctionnement de la trousse.
6. Les barrettes de microplaque non utilisées et dont l'emballage a été ouvert doivent être conservées avec l'agent de dessiccation fourni entre 2 et 8°C dans un sachet fermé.

RECUEIL, TRANSPORT ET CONSERVATION DES PRÉLÈVEMENTS

Les échantillons sériques ou plasmatiques recueillis dans l'EDTA, l'héparine ou le citrate de sodium peuvent être utilisés. Avant de les stocker, vérifier que les caillots sanguins ou les cellules sanguines ont été séparés par centrifugation.

Les échantillons doivent être conservés entre 2 et 8°C si l'analyse doit être réalisée dans les 7 jours suivant le prélèvement et congelés à -20°C ou température inférieure si l'analyse doit être réalisée plus de 7 jours après. Il est préférable d'utiliser des échantillons clairs, non hémolysés. Les échantillons lipémiques, ictériques ou contaminés (par des particules) doivent être filtrés (0,45 µm) ou centrifugés avant analyse.

Le sérum des patients peut être inactivé mais ceci n'est pas indispensable au fonctionnement optimal du test.
Pour l'inactiver, procéder comme suit :
1. Retirer les bouchons des récipients contenant le sérum.
2. Chauffer le sérum à 56°C pendant 30 minutes au bain-marie.
3. Laisser refroidir le sérum avant de refermer les bouchons.
4. Le sérum peut être congelé pour être conservé jusqu'à l'analyse.

Il est déconseillé de soumettre le sérum des patients à des cycles répétés de congélation-décongélation.

MATÉRIEL SUPPLÉEMENTAIRE NÉCESSAIRE NON FOURNI AVEC LE KIT

1. Papier absorbant jetable pour paillasse et serviettes en papier.
2. Tubes ou récipients en polypropylène.
3. Pipettes graduées : 5 ml, 10 ml.
4. Pipette à canaux multiples capable de distribuer 50 µl, 100 µl et 200 µl.
5. Pipette capable de distribuer 1-1000 µl.
6. Embouts de pipette jetables.
7. Réservoirs à réactifs (cuves rectangulaires) ayant une capacité de 25 ml.
8. Eau désionisée ou distillée de qualité réactif.
9. Flacons : 500 ml, 1 litre.
10. Laveur de microplaque ELISA. Il est également possible de procéder à un lavage manuel à l'aide d'une pipette à canaux multiples délivrant des doses de 0,3 ml et d'un dispositif d'aspiration.
11. Un incubateur à 37 ± 1°C.
12. Un lecteur de plaque en microdosage à double (A_{450}-A_{620}) ou simple (A_{450}) longueurd'onde.
13. Solution d'hypochlorite de sodium (5 %) ou eau de Javel liquide domestique.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

1. CONJUGUÉ

a. Le CONJUGUÉ doit être **préparé immédiatement avant utilisation.**

b. Diluer le conjugué au 1/500 dans le diluant fourni avec la trousse (par exemple, 10 µl de conjugué pour 5 ml de diluant).

c. Utiliser exclusivement des récipients et tubes en polypropylène.

d. Un volume de 12,0 ml de CONJUGUÉ DE TRAVAIL est nécessaire pour chaque microplaque.

TABLEAU DE PRÉPARATION DU CONJUGUÉ		
Nombre de tests	Vol. de conjugué (µl)	Vol. de diluant (ml)
24	10,0	5,0
48	15,0	7,5
72	20,0	10,0
96	24,0	12,0

2. TAMPON DE LAVAGE

a. Le TAMPON DE LAVAGE doit être **préparé immédiatement avant utilisation.**

b. Diluer 1 volume de CONCENTRÉ DE LAVAGE dans 19 volumes d'eau distillée. Bien mélanger. Un volume d'approximativement 400 ml de tampon de lavage est nécessaire pour laver 1 plaque.

PROCÉDURE

IMPORTANT : Les immunodosages de ce type sont sensibles à la température et dépendent de la durée du test. Le respect absolu de la procédure d'analyse garantit le fonctionnement optimal du test. Le non-respect de la procédure recommandée peut conduire à l'obtention de résultats aberrants.

1. Sortir la microplaque du sachet aluminium.

2. Secouer les flacons de prélèvement et de contrôle avant utilisation.

3. Remplir un réservoir à réactif de **DILUANT**. À l'aide d'une pipette à canaux multiples, ajouter 200 µl de **DILUANT** dans tous les puits. — 200 µl

4. Les puits A1 et B1 font office de **'BLANCS'. NE PAS AJOUTER DE PRÉLÈVEMENT DANS CES PUITS.** Ajouter 20 µl de diluant supplémentaires dans ces puits. — 20 µl

5. Ajouter 20 µl du prélèvement dans le puits désigné à cet effet, en commençant par le puits H1. Ceci permettra d'obtenir une dilution finale du prélèvement de 1/ 11. **NE PAS METTRE DE PRÉLÈVEMENT DANS UN PUITS SANS DILUANT.** — 20 µl

6. Une fois les prélèvements à analyser ajoutés, ajouter 20 µl de **CONTRÔLE NÉGATIF** par puits dans les puits C1 et D1. — 20 µl

7. Ajouter 20 µl de **CONTRÔLE POSITIF** par puits dans les puits E1, F1 et G1. Mélanger soigneusement en tapotant délicatement de chaque côté de la microplaque tout en veillant à ce que la plaque reste bien à plat sur la paillasse. — 20 µl

8. Recouvrir la microplaque avec précaution à l'aide de l'un des films adhésifs fournis afin d'éviter toute évaporation pendant l'incubation.

9. **Incuber pendant 60 minutes à 37°C. (Ne pas incuber au bain-marie.)** — 60 minutes

10. Préparer le **CONJUGUÉ** comme indiqué dans la section **PRÉPARATION DES RÉACTIFS** avant de laver la microplaque.

11. Retirer et jeter le film adhésif, puis laver la microplaque à l'aide de **TAMPON DE LAVAGE DILUÉ** selon l'une des deux méthodes recommandées. — 300 µl par puits par lavage

A. Laveur automatique ou semi-automatique de microplaque - Laver à six (6) reprises avec au moins 300 µl par puits et par lavage.

B. Lavage manuel de la microplaque : aspirer la totalité du contenu des puits en abaissant délicatement l'embout de l'aspirateur jusqu'au fond de chaque puits. **ATTENTION À NE PAS RAYER LA SURFACE INTERNE DES PUITS.** Remplir la totalité de la plaque avec au moins 300 µl/puits, puis aspirer immédiatement dans le même ordre. Répéter ce cycle à six (6) reprises.

12. Sécher la microplaque en la retournant sur un papier absorbant et en tapotant fermement. Il ne doit pas subsister de tampon de lavage. Tout résidu de tampon de lavage risque d'inhiber l'apparition de la coloration pendant l'incubation avec le substrat.

13. Remplir un réservoir à réactifs avec le **CONJUGUÉ.** À l'aide d'une pipette à canaux multiples, ajouter 100 µl dans chaque puits. Poser un nouveau film adhésif. — 100 µl

14. **Incuber la microplaque pendant 30 minutes à 37°C. (Ne pas incuber au bain-marie.)** — 30 minutes

15. Retirer et jeter le film adhésif. Renouveler les étapes de lavage 11 et 12.

16. Remplir un réservoir à réactif avec du **SUBSTRAT.** À l'aide d'une pipette à canaux multiples, ajouter 100 µl de **SOLUTION DE SUBSTRAT** dans chaque puits. Poser un film couvre-plaques. — 100 µl

17. Incuber pendant 15 minutes à l'obscurité à 37°C. **(Ne pas incuber au bain-marie.)** — 15 minutes

18. Retirer et jeter le film adhésif.

19. À l'aide d'une pipette à canaux multiples, ajouter 100 µl de **SOLUTION D'ARRÊT** dans chaque puits. Mélanger délicatement en tapotant la plaque. — 100 µl

20. Déterminer l'absorbance de chaque puits à 450 nm. Sur un appareil utilisant une longueur d'onde double, la longueur d'onde de référence doit être à 620 nm.

REMARQUE : La lecture de l'absorbance doit être effectuée dans l'heure qui suit l'ajout de la SOLUTION D'ARRÊT.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

1. Le BLANC et le CONTRÔLE NÉGATIF doivent être analysés en double et le CONTRÔLE POSITIF en triple sur chaque plaque, pour chaque lot de prélèvements.

2. L'absorbance du blanc doit être ≤ 0,100.

3. L'absorbance des valeurs de contrôle négatif doit être ≥ 0,000 et ≤ 0,100 après soustraction de la valeur du blanc.

4. Au moins 2 des 3 valeurs du contrôle positif doivent présenter une absorbance ≥ 0,800 après soustraction du blanc. Les valeurs non comprises dans cet intervalle ne doivent pas être utilisées pour calculer la moyenne du contrôle positif ($RC\bar{x}$).

5. Si 2 des valeurs de contrôle positif ou plus s'écartent de la MOYENNE de plus de 30 %, le cycle d'analyse est INVALIDE et doit être renouvelé.

6. Pour que le test soit valable, la différence entre les absorbances moyennes du contrôle positif et du contrôle négatif ($RC\bar{x}$ - $NRC\bar{x}$) doit être de 0,700. Dans le cas contraire, le déroulement des opérations peut être mis en cause et l'analyse doit être renouvelée. Si la différence entre ces absorbances MOYENNES ($RC\bar{x}$ - $NRC\bar{x}$) est systématiquement faible, la possibilité d'une détérioration des réactifs peut être envisagée.

RÉSULTATS

Chaque microplaque doit être prise en compte séparément lors du calcul et de l'interprétation des résultats de l'analyse, indépendamment du nombre de plaques utilisées au cours d'une même analyse.

LES VALEURS D'ABSORBANCE MOYENNE DU « BLANC » DOIVENT ETRE DÉDUITES DE TOUTES LES VALEURS D'ABSORBANCE DE LA PLAQUE AVANT L'INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.

La présence ou l'absence d'anticorps spécifiques dirigés contre le HTLV-I/II est déterminée par comparaison de l'absorbance des prélèvements par rapport à la VALEUR SEUIL (VS) de la plaque.

La VALEUR SEUIL est calculée par addition de 0,45 unité d'absorbance à l'absorbance moyenne NRC :

VALEUR SEUIL = 0,45 + $NRC\bar{x}$

CALCUL DES RÉSULTATS

1. Calcul de l'absorbance moyenne du contrôle négatif ($NRC\bar{x}$)

Exemple :	Puits N°	Absorbance
	C1	0,020
	D1	0,022
	Total	0,042
	Moyenne	0,042 / 2 = 0,021 ($NRC\bar{x}$)

Chaque valeur du contrôle négatif devrait être ≤ 0,100 unité.

Si l'une des valeurs de contrôle négatif ne répond pas aux deux critères ci-dessus, l'analyse est invalide et doit être renouvelée.

2. Calcul de l'absorbance moyenne du contrôle positif ($RC\bar{x}$)

Exemple :	Puits N°	Absorbance
	E1	1,221
	F1	1,144
	G1	1,298
	Total	3,663
	Moyenne	3,663 / 3 = 1,221 ($RC\bar{x}$)

Chaque valeur du contrôle positif doit être ≥ 0,800 unité.

Si l'une des valeurs de contrôle positif ne remplit pas les critères ci-dessus, celle-ci doit être exclue car elle peut entraîner l'obtention de résultats aberrants. La moyenne du contrôle positif ($RC\bar{x}$) doit alors être recalculée d'après les valeurs de contrôle positif restantes. Toutes les valeurs de contrôle positif restantes doivent répondre aux critères ci-dessus, sans quoi l'analyse est invalide et doit être renouvelée.

3. Calcul de la différence entre $RC\bar{x}$ et $NRC\bar{x}$

Exemple : $NRC\bar{x}$ = 0,021
$RC\bar{x}$ = 1,221
$RC\bar{x} - NRC\bar{x}$ = 1,221 - 0,021
= 1,200

Pour que le test soit valide, la valeur $RC\bar{x} - NRC\bar{x}$ doit être de 0,700. Dans le cas contraire, une manipulation incorrecte ou une détérioration des réactifs peut être mise en cause et l'analyse doit être renouvelée.

4. Calcul de la valeur SEUIL

Valeur SEUIL = 0,450 + $NRC\bar{x}$
Exemple : $NRC\bar{x}$ = 0,021
Valeur SEUIL = 0,450 + 0,021
= 0,471

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1. Les prélèvements dont les valeurs d'absorbance sont < à la valeur SEUIL sont considérés comme **négatifs** au test HTLV I/II ELISA 3.0 de MPD.
2. Les prélèvements dont les absorbances sont **supérieures ou égales à** la valeur SEUIL sont considérés comme **initialement positifs** d'après les critères du test HTLV I/II ELISA 3.0 de MPD et doivent être réanalysés en double avant interprétation.
3. Les prélèvements apparaissant comme positifs après renouvellement de l'analyse peuvent être interprétés comme étant **positifs reproductibles** vis-à-vis des anticorps dirigés contre les virus HTLV-I/II d'après les critères du test HTLV I/II ELISA 3.0 de MPD.
4. Les prélèvements initialement positifs apparaissant comme **négatifs** après renouvellement de l'analyse sont considérés comme **négatifs** d'après les critères du test HTLV I/II ELISA 3.0 de MPD.
5. Les prélèvements apparaissant comme positifs reproductibles au test HTLV I/II ELISA 3.0 de MPD doivent être soumis à des analyses supplémentaires à l'aide d'autres tests plus spécifiques, tels que le test HTLV BLOT 2.4 de MPD.

CARACTÉRISTIQUES SPÉCIFIQUES DE FONCTIONNEMENT

Le test HTLV I/II ELISA 3.0 de MPD (version TMB) est équivalent au test HTLV I/II ELISA 3.0 de MPD (version OPD). D'un point de vue technique et biologique, ils se caractérisent par leur similarité en termes de :

- conditions d'utilisation ;
- spécifications / propriétés ;
- conception ;
- mode de mise en œuvre ;
- principe de fonctionnement ;
- liquides organiques et réactifs.

Les deux essais sont toutefois différents en termes de :

- substrat utilisé (OPD contre TMB) ;
- type et volume de solution d'arrêt requis (acide sulfurique contre acide chlorhydrique) ;
- longueur d'onde retenue pour la lecture du test (492 nm contre 450 nm).

Le fonctionnement du test HTLV I/II ELISA 3.0 de MPD pour la détection des anticorps dirigés contre le HTLV-I et le HTLV-II a donc été évalué à l'aide de la version OPD. Les résultats obtenus figurant ci-dessous ont été étendus à la version TMB.

REMARQUE : l'étude australienne a été menée avec les deux types de substrat (OPD et TMB) et a affiché des résultats identiques [155/155] pour les deux types de substrat (≥ 99,9 %).

Sensibilité
420 échantillons positifs (test ELISA et/ou transfert Western) ont fait l'objet de trois évaluations menées dans trois laboratoires différents : en interne pour la première, en Suède et en Australie pour les deux autres. L'étude suédoise (n=163) révèle une sensibilité comparable à un système d'analyse de pointe. L'évaluation australienne (n=155) montre une sensibilité de 100 %, contre 99 % pour l'évaluation en interne (105/106) réalisée avec des échantillons commerciaux et un panel de contrôle à titrage variable PRP206. Le seul échantillon révélé négatif par le test HTLV I/II ELISA 3.0 de MPD lors de l'évaluation en interne avait également donné des résultats négatifs lors d'un test ELISA concurrent et des résultats indéterminés par transfert Western, avec la présence de bandes GD21 et p19 peu marquées.

Les trois évaluations indiquent une sensibilité globale supérieure à 99,7 %.

Spécificité
Un total de 5.300 échantillons se composant d'échantillons aléatoires de donneurs de sang (5.000), d'échantillons cliniques (200) et d'échantillons potentiellement contaminants (100) a été testé. La spécificité diagnostique constatée sur les échantillons aléatoires de donneurs de sang, sur les échantillons cliniques et sur les échantillons potentiellement contaminants est respectivement de 99,8 %, 98 % et 97 %. Le test HTLV I/II ELISA 3.0 de MPD montre une spécificité élevée, supérieure à 99 % pour les trois séries d'échantillons testées.

Reproductibilité
La reproductibilité inter-lots et intra-lot du test HTLV I/II ELISA 3.0 de MPD a été déterminée en interne à l'aide des contrôles de la trousse, d'un échantillon HTLV-I positif, d'un échantillon HTLV I/II négatif et d'ACCURUN 24, un sérum de contrôle multiparamétrique de BBI.

Inter-lots : deux lots de microplaques ont été analysés à quatre reprises avec trois extraits identiques de chaque contrôle de la trousse et huit extraits identiques des échantillons restants à chaque fois.

Intra-lot : un lot de microplaques a été analysé deux fois dans la même journée avec huit extraits identiques de chaque échantillon incluant les contrôles de la trousse pour chaque cycle d'analyse sur quatre jours.

Les résultats indiquent un coefficient de variation (CV) de 3 à 8 % pour les échantillons analysés.

LIMITES DE LA MÉTHODE

Les résultats positifs de façon répétée avec le test HTLV I/II ELISA 3.0 de MPD indiquent la possible présence d'anticorps dirigés contre le HTLV-I/II dans le prélèvement. Un résultat **NÉGATIF** au test HTLV I/II ELISA 3.0 de MPD signale l'absence probable d'anticorps détectables dirigés contre le HTLV-I/II dans le prélèvement. Cependant, on ne dispose pas de suffisamment d'éléments pour exclure la possibilité d'une transmission du HTLV-I/II dans les échantillons sanguins apparaissant comme négatifs au test HTLV I/II ELISA 3.0 de MPD . Un résultat **NÉGATIF** ne permet donc pas d'exclure la possibilité d'une exposition au HTLV-I/II ou d'une infection par le virus.

La possibilité de faux positifs doit être prise en compte avec les trousses d'analyse de ce type. La proportion de faux positifs dépend de la sensibilité et de la spécificité de la trousse d'analyse. Pour la plupart des tests de dépistage, plus la prévalence de l'anticorps anti-HTLV-I/II est élevée dans une population, plus la proportion de faux positifs est réduite.

LIMITES DE GARANTIE

Le fabricant ne garantit explicitement la trousse d'analyse que pour un usage diagnostique *in vitro* sous réserve que soient respectées les spécifications et limites décrites dans le mode d'emploi du produit et que celui-ci soit utilisé conformément aux présentes instructions. Le fabricant décline toute responsabilité, explicite ou implicite, y compris celle, implicite ou explicite, liée à la qualité marchande, l'aptitude à l'emploi ou le fonctionnement implicite à une autre fin particulière. Le fabricant ne peut s'engager que sur un remplacement ou un remboursement du produit. Le fabricant ne peut être tenu responsable par l'acheteur ou toute autre partie d'aucune détérioration, blessure ou perte financière résultant de l'utilisation du produit.

PROBLÈMES TECHNIQUES / RÉCLAMATIONS

Dans l'éventualité d'un problème technique / d'une réclamation, procéder comme suit :

1. Noter le numéro de lot de la trousse et sa date de péremption.
2. Conserver les trousses et les résultats obtenus.
3. Contacter le bureau MP Biomedicals le plus proche ou votre distributeur local.

BIBLIOGRAPHIE

1. Poisez B.J. et al., Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980, 77:7145-7419.

2. Kalyanaraman V.S., et al., A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. Science 1982; 218:571-573.

3. Williams A.E. et al., Seroprevalence and epidemiological correlates of HTLV-I infection in U.S. blood donors. Science 1988; 240:643-646.

4. Lipka J.J., et. al., 1990. Enhancing the sensitivity of HTLV-I immunoassays in Human Retrovirology : HTLV, Edt W.A. Blattner, Raven Press (NY). pp 409-475.

5. Lee H. et. al., High rate of HTLV-II infection in seropositive IV drug abusers in New Orleans. Science 1989; 244:471-475.

6. Lipka J.J. et. al., Modified Western Blot Assay for confirmation and differentiation of Human T-cell Lymphotropic Virus Type-I and II. J. Infect Dis. 1991; 164:400-403.

7. Lipka J.J. et. al., Segregation of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type I and II infections by Antibody Reactivity to Unique Viral Epitopes.J. Infect. Dis. 1992; 165:268-272.

8. Hadlock K.G., Goh C.J., Bradshaw P.A.,Perkins S., Lo J., Habbas R.K., Kaplan L., and Foung S.K.H. Delineation of an Immunodominant and highly HTLV specific epitope within the HTLV-I transmembrane glycoprotein. Blood 1995; 68 (4):392-1399.

9. Varma M., Rudolph D., Knuchel M., Switzer W., Hadlock K.G., Velligan M., Chan L., Foung S.K.H., and Lal R.B., Enhanced specificity of truncated transmembrane protein for serologic confirmation of HTLV-I and HTLV-II infection by Western Blot assay containing recombinant envelope glycoproteins.J.Clin.Micro,1995; 33(12):3239-3244.

MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd.
85 Science Park Drive
#04-01, The Cavendish
Singapore Science Park
Singapour 118259
Tél. : +65-6775 0008
Fax : +65-6775 4536
Courriel : enquiry_ap@mpbio.com

EC REP
Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St.Ingbert
Allemagne
Tél. : + 49-68 94 - 58 1020
Fax : + 49-68 94 - 58 1021
Courriel : info@mt-procons.com

Bureaux régionaux :

MP Biomedicals Suisse S.A.
Halle de Fret/Aeroport
P.O. Box 1015
1211 Genève 5
Suisse
Tél. : (4122) 788-1908
Fax : (4122) 788-1986
Courriel : mpbiosuisse@mpbio.com

*	Brevet australien	613350, 667189, 690540
*	Brevet États-Unis	5,066,579, 5,614,366 5,763,572, 5,814,441 5,871,933, 5,643,714
*	Brevet canadien	1337799
*	Brevet européen	0395634
*	Brevet japonais	2559482

* Le nom et le logo Genelabs sont concédés sous licence par Genelabs Technologies, Inc.